



ARAŞTIRMA

F.Ü. Sađ.Bil.Tıp.Derg.
2023; 37 (2): 120 - 125
http://www.fusabil.org

Elif ONAT ^{1, a}
Nevin KOCAMAN ^{2, b}
Tuba KARAKAŞ ^{2, c}

¹ Adıyaman Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim
Dalı,
Adıyaman, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji Embriyoloji Ana
Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-3109-6562

^b ORCID: 0000-0002-6682-6345

^c ORCID: 0000-0001-8833-7131

Miyokard İnfarktüsü Oluşturulan Sıçanlarda Humaninin Akciğerler Üzerine Koruyucu Etkisi: TRPM2'nin Rolü

Amaç: Bu çalışmada, miyokard infarktüsü (MI) öncesi sıçanlara humanin (HN) uygulanarak, MI'da akciğerler üzerine koruyucu etkisinde geçici reseptör potansiyeli (TRP) melastatin benzeri alt aile üyesi 2'nin (TRPM2) olası rolü araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sıçanlar 7 gruba (n=6) ayrılmıştır (kontrol, 2 grup HN, 2 grup MI, 2 grup MI+HN). MI oluşturmak için sıçanlara 200mg/kg isoproterenol (ISO) subkutan olarak uygulanmıştır. Sıçanlara tek başına ve MI öncesi intraperitoneal (ip) olarak 2 mg/kg HN verilmiştir. Akciğer dokusunda TRPM2 düzeyi immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmada akciğer dokusunda damarların ve bronşollerin düz kas yapılarında ve interalveoler alanlarında TRPM2 ekspresyonu gözlemlendi. TRPM2 düzeylerinin MI sonrası özellikle 7. güne doğru arttığı, MI öncesi HN uygulamasından sonra ise 7. güne doğru daha anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Sadece HN verilen gruplarda ise, TRPM2 düzeyleri açısından bir değişiklik gözlenmemiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, HN'nin MI'de akciğerler üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu ve bu etkisine TRPM2'nin aracılık edebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Miyokard İnfarktüsü, akciğer, humanin, TRPM2

Protective Effect of Humanin on the Lungs by Myocard Infarct Induced Rats: The Role of TRPM2

Objective: In this study, the potential role of transient receptor potential (TRP) melastatin-like subfamily member 2 (TRPM2) in its protective effect on the lungs in MI by administering humanin (HN) to rats before myocardial infarction (MI) was investigated.

Materials and Method: Rats were divided into 7 groups (n=6) (control, 2 groups of HN, 2 groups of MI, 2 groups of MI+HN). To induce MI, 200mg/kg isoproterenol (ISO) was administered subcutaneously to rats. Rats were given 2 mg/kg HN as a single agent intraperitoneally (ip) before MI. TRPM2 level in lung tissue was examined immunohistochemically.

Results: In the study, TRPM2 expression was observed in the smooth muscle structures and interalveolar areas of vessels and bronchioles in the lung tissue. It was observed that TRPM2 levels increased especially towards the 7th day after MI, and decreased more significantly towards the 7th day after HN administration before MI. In the groups where only HN was administered, no change was observed in terms of TRPM2 levels.

Conclusion: In this study, it was concluded that HN has a protective effect on the lungs in MI and this effect may be mediated by TRPM2

Key Words: Myocardial Infarction, lung, humanin, TRPM2

Giriş

Miyokardiyal iskemi/reperfüzyonun (I/R) uzak organlarda hasara neden olabileceği ve akciğerin en çok etkilenen organlardan biri olduğu gösterilmiştir (1, 2). Aynı zamanda, kalbin I/R'sinin akciğerlerde neden olduğu hasarın, hastaların tedavisi ve prognozu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (2). Miyokardiyal I/R'yi takiben akciğer hasarı, esas olarak, alveolar hücre mitokondrilerini uyaran çok sayıda sitokin ve serbest oksijen radikalleri üreten, pulmoner kapiller geçirgenliğin artmasına ve akciğer hasarının ilerlemesine yol açan önemli bir polimorfonükleer lökosit birikimi ile karakterize edilir (1). Sistemik immün yanıtta genellikle akciğer, karaciğer, kalp ve böbrek I/R hasarı neden olur. Bu uzak organların yaralanması genellikle beyaz kan hücresi izolasyonu ve akciğer dokularından enzimlerin salınması ile ilişkili akut bir bağıklık tepkisine neden olur. Bu durum, perivasküler ve interstisyel ödeme neden olan vasküler geçirgenliği artırır, pulmoner hipertansiyon ve ödeme yol açar. Uzak organlarda I/R yaralanmalarının neden olduğu akciğer hastalıkları sıklıkla klinik solunum sıkıntısı sendromlarına yol açar (3).

ISO, otooksidasyondan sonra yüksek seviyelerde reaktif serbest radikaller üreten sentetik bir katekolamin ve β -adrenerjik reseptör agonistidir (4). Yüksek dozlarda uygulandığında miyokardda ciddi oksidatif strese neden olarak infarktüs benzeri lezyonlara neden olur (5). Hayvanlarda deneysel MI indüksiyonu için ISO kullanmak,

Geliş Tarihi : 14.01.2023
Kabul Tarihi : 17.03.2023

Yazışma Adresi Correspondence

Elif ONAT
Adıyaman Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Ana
Bilim Dalı,
Adıyaman - TÜRKİYE

drelifonat@gmail.com

kardiyoprotektif etkileri olan çeşitli bileşiklerin etkilerini incelemek için iyi kurulmuş bir modeldir

HN, başlangıçta Alzheimer hastalığı (AD) olan hastalarda hayatta kalan nöronlarda tanımlanan, biyolojik olarak aktif 24 aminoasitli bir peptittir (6). HN'nin, AD, kardiyovasküler hastalık, inme, MI, diyabet ve kanser gibi hastalıklarda koruyucu bir rol oynayan apoptoz, hücre sağkalımı, lipid akışı ve inflamasyon dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer aldığı gösterilmiştir (7, 8). HN ve analoglarının, hücreleri çeşitli stres faktörlerine karşı koruduğu gösterilmiştir. HN ayrıca nöronları oksijen-glikoz yoksunluğundan, hipoksi kaynaklı hücre ölümü, in vitro ve in vivo serebral infarktüstten korur (9). HN'nin farelerde I/R koşulları altında kardiyak koruma sağladığı ve kültürdeki kardiyomyoblastlarda oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (10, 11). Ayrıca yapılan popülasyon çalışmasında, normal insanlara göre koroner kalp hastalığı olan hastalarda HN düzeyinin düştüğü ve laktik asit düzeyinin arttığı saptanmış, bu da HN'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki koruyucu etkisinin antioksidan etki yoluyla olduğunu düşündürmektedir (12). HN, gelecekte koroner kalp hastalığının tedavisi için bir hedef olabilecek koroner arter endotel fonksiyonu ile pozitif korelasyona sahiptir (13). Kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu etki gösteren bu peptidin akciğerler üzerine etkisi pek bilinmemektedir.

TRPM2 (daha önce TRPC7 veya LTRPC2 olarak rapor edilmiştir) insan kromozomu 21'de yer alan bir TRPM2 geni tarafından kodlanan, seçici olmayan kalsiyum geçirgen bir katyon kanalıdır (14). Ekspresyonu kemik iliği, akciğer, kalp, karaciğer, dalak, pankreas, göz, beyin, makrofajlar, nötrofiller ve endotel hücreleri gibi birçok memeli dokusunda gösterilmiştir (15). TRPM2 kanal aktivitesinin şimdiye kadar I/R hasarına hücresel yanıt, endotelial geçirgenliğin düzenlenmesi, iltihaplanma, kanser, dejeneratif hastalıkların gelişimi, apoptoz ve otofaji gibi olaylarla ilişkili olduğu görülmüştür (16-20). Bu nedenle, TRPM2 çekici bir farmakolojik hedef haline gelmiştir.

Çeşitli farmakolojik ajanların MI öncesi/sırasında uygulanmaları nedeniyle koruyucu etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Bunlardan biri olan HN'nin MI öncesi uygulanarak kardiyak koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir ancak HN'nin MI sonrası en çok etkilenen organlardan biri olan akciğerler üzerine etkisi bilinmemektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, HN'nin MI'da akciğerler üzerine koruyucu bir etkisinin olup olmadığının araştırılması ve bu etkisinde TRPM2'nin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Bu çalışma, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2022/079 protokol numarası, 29.12.2022 tarihi ve 2 sayılı kararı ile doku etiği alınarak yapılmıştır.

Çalışmada Adıyaman Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan 200-250 gr ağırlığında toplam 42 adet Sprague-Dawley cinsi (8-10 haftalık)

erkek sıçan kullanıldı ve hayvanlara aynı ortamda standart su ve yem verildi ve ad libitum beslenmeleri sağlandı. Deney hayvanları 7 gruba ayrıldı (n=6); grup I (kontrol), grup II (HN 48. saat), grup III (HN 7. gün), grup IV (MI 48. saat), grup V (MI 7. gün), grup VI (MI+HN 48. saat), grup VII (MI+HN 7. gün) (21). Kontrol grubuna deney boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. Grup II ve III'deki sıçanlara 2 mg/kg HN (H6161, Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, ABD) tek başına uygulandı (22). Diğer gruplardaki sıçanlara MI oluşturmaya için 200 mg/kg ISO (Isoproterenol hydrochloride, I5627, Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, ABD) subkutan yoldan uygulandı. Grup VI ve VII'deki sıçanlara ISO uygulamasından önce HN (2 mg/kg) uygulandı. Grup II, IV ve VI'daki sıçanlardan 48. saatte, Grup III, V ve VII'deki sıçanlardan 7.günde ip ketamin (75 mg/kg)+xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında kalpten kan alınarak deney sonlandırıldı. Daha sonra akciğer dokusu histopatolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi ve serum örnekleri biyokimyasal çalışmalar için -80°C'de saklandı.

İmmünohistokimyasal İnceleme: Deney hayvanlarının akciğer dokuları rutin histolojik takip serilerinden geçirildi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4-6 µm kalınlığında kesitler lamlara alındı ve deparafinize edildi. Daha sonra alkol serisinden geçirilen kesitler sitrat tampon solüsyonunda pH=6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra soğutulmak üzere oda sıcaklığında bekletilen dokular fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 6 dakika hidrojen peroksit solüsyonu uygulandı. Blok solüsyon PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokulara 5 dakika uygulandıktan sonra 1/250 dilüe edilerek primer antikor (Rabbit poliklonal anti-TRPM2 antibody (Ab-11168), abcam, chamberidge, UK) oda sıcaklığında nemli bir ortamda 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulamasının ardından dokular 3x5 dakika PBS ile yıkandı ve primer antikor ile uyumlu sekonder antikor ile oda sıcaklığında nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi. Sekonder antikor uygulamasından sonra dokular 3x5 dakika PBS ile yıkandı ve streptavidin ile oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) substratı + AEC kromojen solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra tüm gruplar eş zamanlı olarak PBS ile yıkandı. Mayer's hematoksilin ile zıt boyaması yapılan dokular, PBS ve distile sudan geçirildi ve su bazlı kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Preparatlar bir zeiss axio (Scope A1 Berlin, Almanya) mikroskobu altında değerlendirildi ve fotoğraflandı. Gruplar kendi aralarında Beta HCG ekspresyonu açısından karşılaştırıldı.

İstatistiksel Analiz

Power Analizi: Bu çalışmada on bağımsız grubun örnek büyüklüklerini hesaplamak için G*power (3.1.9.2 version) programı ANOVA'nın sabit etkili tek yönlü modelinin prosedürü kullanıldı. Etki büyüklüğü 0.75, hedef güç 0.90 ve anlamlılık seviyesi 0.05 olarak kabul edildiğinde gerçek güç 0.94 ve her grup için 6 rat, toplamda 42 rat olarak belirlendi.

Analizler için SPSS versiyon 22 (IBM Corporation, ABD) kullanıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. One-way ANOVA testi yapıldı ve Tukey HSD testi kullanılarak post hoc çoklu karşılaştırmalar yapıldı. Veriler ortalama \pm SD olarak verildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

İmmünohistokimyasal bulgular: Akciğer dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında gözlemlenmesi sonucu; Akciğer dokularındaki TRPM2

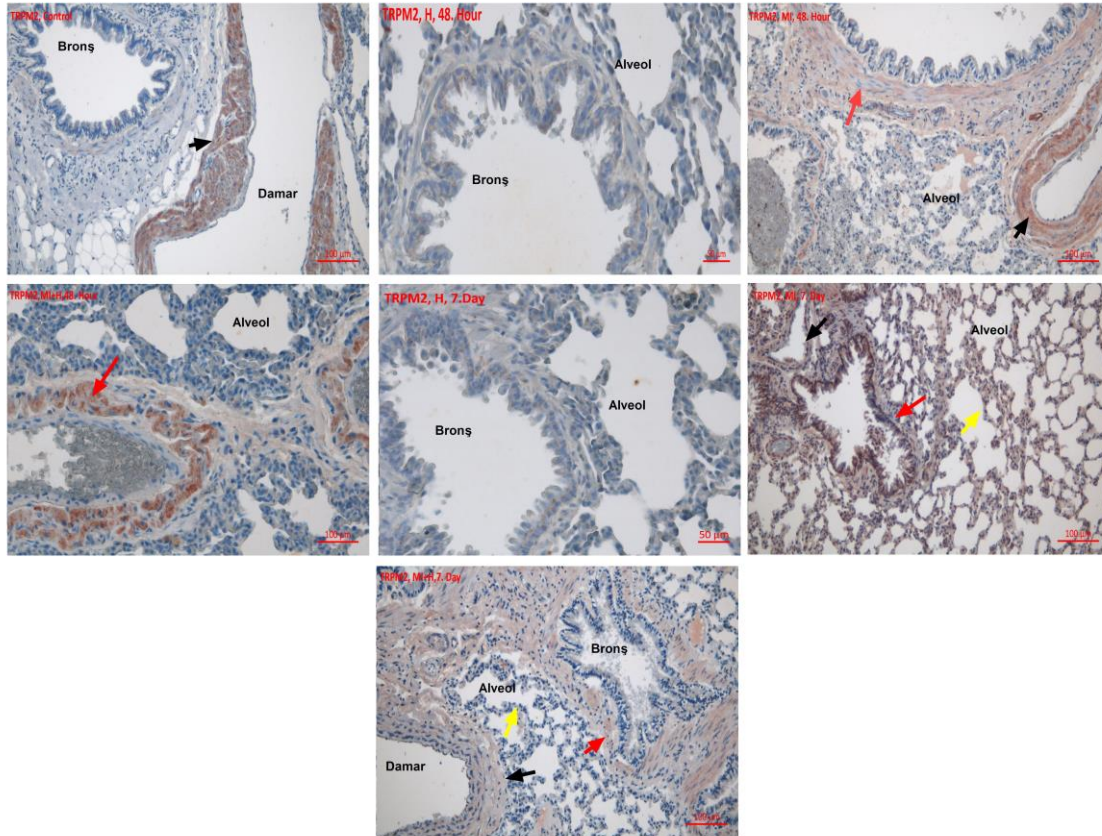
immünreaktivitesi damarların ve bronşiollerin düz kas yapılarında ve interalveoler alanlarında görüldü.

TRPM2 immünreaktivitesi; Bronşiol ve alveollerde kontrol, HN 48.saat, HN 7.gün grubuyla kıyaslandığında MI'de özellikle de 7.günde belirgin artış görülmüştür ($p < 0.001$). MI 7.gün grubu ile kıyaslandığında MI+HN 7.gün grubunda bronşiol ve alveollerde TRPM2 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.001$) (Tablo1) (Şekil 1). Damarlarda kontrol grubuna göre, MI'de 7.günde anlamlı olmayan bir artış görüldü ($p = 0.304$). MI 7.gün grubu ile kıyaslandığında MI+HN 7.gün grubunda damarlarda TRPM2 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p = 0.009$) (Tablo1) (Şekil 1).

Tablo 1. Akciğer dokusunda TRPM2 için immünohistokimyasal bulgular

Gruplar	Kontrol	HN 48.saat	HN 7.gün	MI 48.saat	MI 7.gün	MI+HN 48.saat	MI+HN 7.gün
TRPM2 Bronşiol	0.07 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03	0.73 \pm 0.19abc	2.44 \pm 0.44abcd	0.81 \pm 0.15abce	0.47 \pm 0.10abce
TRPM2 Alveol	0.04 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	0.09 \pm 0.19	1.67 \pm 0.54abcd	0.09 \pm 0.02e	0.09 \pm 0.02e
TRPM2 Damar	1.84 \pm 0.44	1.54 \pm 0.32	1.84 \pm 0.44	1.67 \pm 0.54	2.44 \pm 0.44b	1.46 \pm 0.32e	1.46 \pm 0.32e

Hata çubukları SD'yi gösterir. a. kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ b. HN 48. saat ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ c. HN 7. gün ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ d. MI 48. saat ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ e. MI 7. gün ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.



Şekil 1. Akciğer dokusunda TRPM2 için immünohistokimyasal bulgular (kontrol, HN 48. saat, HN 7. gün, MI 48. saat, MI 7. gün, MI+HN 48. saat, MI+HN 7. gün)

Tartışma

Endojen aktif bir peptit olan HN'nin miyokardiyal hasar üzerindeki koruyucu etkisi in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiş olsa da, HN'nin MI'de en sık etkilenen organlardan biri olan akciğerler üzerine koruyucu etkisi bilinmemektedir. HN'nin miyokardiyal hasarda akciğerler üzerine koruyuculuğunun ve bu etkisinde TRPM2'nin rolünün araştırıldığı bu çalışmada, ISO ile MI oluşturulan sıçanlarda HN'nin MI öncesi uygulanması ile akciğerlerde özellikle bronşiol, alveol ve damarlar üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu histopatolojik bulgularla desteklendiği gibi, TRPM2'nin bu etki mekanizmasında yer alabileceği ilk kez gösterilmiştir.

Son yıllarda çok sayıda çalışma, yaşa bağlı bozukluklarda antioksidatif, anti-enflamatuar ve antiapoptotik etkiler gösteren HN ve analogu S14G-HN'nin (HNG) yararlı özelliklerini ortaya koymuştur (23). HN'nin sadece AD'de değil, aynı zamanda Tip 2 Diabetes Mellitus, kardiovasküler hastalıklar ve aterosklerozda koruyucu rolü olduğu bulunmuştur (24-28). KOAH'lı hastalarla ilgili yapılan bir çalışmada, mitokinler arasında HN'in en güçlü prognostik değeri gösterdiği ve bu hastalıkta gelecekte bir risk biyobelirteci olabileceği düşünülmüştür. KOAH'ta artan HN seviyeleri, mitokondriyi ve dolayısıyla hücreleri oksidatif strese karşı korumak için telafi edici bir reaksiyon gibi görünmektedir (29). Zhang ve ark. (30), farelerin HN takviyeli bir diyetle beslendiklerinde, artan antianjiyojenik proteinleri eksprese ettiklerini ve pulmoner hipertansiyon modellerinde zayıflamış vasküler yeniden şekillenme ve fibroze yol açan SMC hiperplazisinde yer alan bir protein olan anjiyopöietin-1'i inhibe ettiğini göstermişlerdir. Literatür bilgileri ile uyumlu olarak bu çalışmada, MI'da HN'nin akciğerler üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği ve aynı zamanda enflamasyon ve oksidatif strese önemli rol oynayan TRPM2'nin MI'lu sıçanların akciğer dokusunda özellikle bronşiol ve alveollerde arttığı, HN tedavisi uygulanması ile azaldığı gösterilmiştir. HN'nin bu koruyucu etkisinde, TRPM2 üzerinden antioksidatif ve anti-enflamatuar etkileri rol oynuyor olabilir. Çünkü, TRPM2 büyük ölçüde enflamatuar tepkilerde üretilen ısı, reaktif oksijen türleri (ROS), hücre içi Ca²⁺ ve ADP-riboz (ADPR) tarafından aktive edilen seçici olmayan bir katyon kanalıdır. TRPM2, miyeloid hücrelerde yaygın olarak eksprese edilir ve TRPM2 aracılı Ca²⁺ sinyali, makrofaj aktivasyonu ve fagositik fonksiyonlar için önemlidir. TRPM2'nin devre dışı bırakılmasının makrofajlarda ROS üretimini azalttığı ve bir akciğer hasarı fare modelinde doku hasarını azalttığı bulunmuştur (31). Bir başka çalışmada ise, TRPM2'nin, kalp damarı ve pulmoner

arter endotelinde bir oksidan sensör olarak görev yaptığı ve lökositlerin aktivasyonu, vasküler endotelial geçirgenliği ve yaralanmada anahtar rol oynayabileceği tanımlanmıştır (32, 33). İnsan pulmoner arter endotel hücrelerinde TRPM2, ikinci haberci ADP riboz üretimini içeren mekanizmalarla endotelium üzerindeki oksidanların etkilerine aracılık etmekten sorumlu olarak tanımlanmıştır (32). Oksidatif stres, aktif akciğer makrofajlarının ve infiltrate nötrofillerin ürünleri tarafından başlatılır (34, 35). Spesifik olarak, H₂O₂ gibi oksijen metabolitlerinin ve kemokinler olarak da adlandırılan kemotaktik sitokinlerin üretimi yoluyla oksidan stres, doku ödemi oluşumunu ve nötrofil ekstravazasyonunu yöneten kritik faktörler olan nötrofillerin endotelial yapışkanlığını ve vasküler endotelial geçirgenliği artırır (36-39). Kemokin ekspresyonu indüklenelirdir ve enflamatuar hücrelerin enfeksiyon veya yaralanma bölgelerine alınmasından sorumludur (40, 41). Yakın tarihli bir çalışmada ise, kemokin üretimine ve nötrofil kaynaklı akciğer hasarına aracılık etmede monosit TRPM2 kanallarının fonksiyonel rolü gösterilmektedir (42). Spesifik olarak, H₂O₂, Ca²⁺ya bağımlı tirozin kinaz Pyk2'yi etkinleştirmek ve Ras GTPaz yoluyla Erk sinyali yükseltmek için TRPM2 yoluyla Ca²⁺ akışı uyarılır. Bu, kemokinlerin üretimini artırmak için gerekli olan nükleer faktör-B'nin (Nf-kB) nükleer translokasyonunu ortaya çıkarır. Bu nedenle, TRPM2 ile ortaya çıkan Ca²⁺ akışı, kemokin üretiminden sorumlu oksidan kaynaklı sinyal kaskadını kontrol eder, bu da nötrofillerin endotelial yapışkanlığını ve ROS oluşumunu artırır ve böylece endotelial inflamasyonu ve hasarı şiddetlendirir (42). Kronik inflamasyonda, nötrofiller tarafından devam eden ROS üretimi, geniş doku hasarına neden olur. Bütün bu çalışmalar, HN'nin koruyucu etkisinde TRPM2'nin bu mekanizmalar üzerinden aracı olabileceği ihtimalini daha da güçlendirmektedir. Ancak, HN'nin akciğerler üzerindeki koruyuculuğu hakkında kesin bilgi sahibi olabilmek için diğer yollarla ilişkisinin de araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın en önemli limitasyonları, bulguların ELISA, PCR ve Western blot analizi gibi yöntemlerle desteklenmemiş olmasıdır. HN'nin TRPM2 ile ilişkisini açıklayan ileri çalışmalar, çalışmamızın moleküler mekanizmalarını daha iyi açıklayacaktır.

Sonuç olarak; bu çalışmada, HN'nin MI'da akciğerlerde özellikle bronşiol, alveol ve damarlar üzerinde koruyucu etkisi olabileceği ve bu mekanizmada TRPM2'nin rol alabileceği ilk kez gösterilmiştir. Mevcut bulgularımız, MI sonrası uzak doku hasarının en sık görüldüğü organlardan biri olan akciğerlerin tedavisi için umut vadebilir.

Kaynaklar

1. Wang Y, Ji M, Chen L, Wu X, Wang L. Breviscapine reduces acute lung injury induced by left heart ischemic reperfusion in rats by inhibiting the expression of ICAM-1 and IL-18. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2013; 6(5): 1322-1326.
2. Zhang W, Guo Y, Yu S, Wei J, Jin J. Effects of edaravone on the expression of β -defensin-2 mRNA in lung tissue of

rats with myocardial ischemia reperfusion. *Molecular Medicine Reports* 2013; 7(5): 1683-1687.

3. Waisman D, Brod V, Dickstein R, et al. Effects of inhaled nitric oxide on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Shock* 2005; 23(2): 150-155.
4. Huang H, Geng Q, Yao H, et al. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by

- isoprenaline in rats. *Iran. J Basic Med Sci* 2018; 21: 267-276.
5. Panda S, Kar A, Biswas S. Preventive effect of agnucastolide C against isoproterenol-induced myocardial injury. *Sci Rep* 2017; 7: 16146.
 6. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:6336-6341.
 7. Gong Z, Tas E, Muzumdar R. Humanin and age-related diseases: A new link? *Front Endocrinol* 2014; 5: 210.
 8. Gong Z, Su K, Cui L, et al. Central effects of humanin on hepatic triglyceride secretion. *Am. J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 309: 283-292.
 9. Xu X, Chua K.W, Chua C.C, et al. Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain Res* 2010; 1355:189-194.
 10. Muzumdar R.H, Huffman D.M, Calvert J.W, et al. Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1940-1948.
 11. Klein L.E, Cui L, Gong Z, Su K, Muzumdar R. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440: 197-203.
 12. Zhloba AA, Subbotina TF, Molchan NS, Polushin YS. The Level of Circulating Humanin in Patients With Ischemic Heart Disease. *Klin Lab Diagn* 2018; 63: 466-470.
 13. Widmer RJ, Flammer AJ, Herrmann J, et al. Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304: H3937.
 14. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, et al. LTRPC2 Ca²⁺-Permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9:163-173.
 15. Hecquet C.M, Ahmmed G.U, Vogel S.M, Malik A.B. Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2008; 102: 347-355.
 16. Zhang H, Yu P, Lin H, et al. The discovery of novel ACA derivatives as specific TRPM2 inhibitors that reduce ischemic injury both in vitro and in vivo. *J Med Chem* 2021; 64: 3976-3996.
 17. Miyanojara J, Kakae M, Nagayasu K, et al. TRPM2 channel aggravates cns inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion. *J Neurosci* 2018; 38:3520-3533.
 18. Zeng X, Sikka S.C, Huang L, et al. Novel role for the transient receptor potential channel TRPM2 in prostate cancer cell proliferation. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2009;13: 195-201.
 19. Sun L, Yau H.-Y, Wong W.-Y, et al. Role of TRPM2 in H₂O₂-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS ONE* 2012;7: e43186.
 20. Zhao Q, Li J, Ko W.-H, et al. TRPM2 promotes autophagic degradation in vascular smooth muscle cells. *Sci Rep* 2020; 10: 1-11.
 21. Erten M, Çimenci İG, Kuloğlu T, Kalaycı M, Erten F. The relationship between visfatin and cardiac markers on induced myocardial infarction in rats. *Cytokine* 2019; 115: 116-120.
 22. Muzumdar R.H, Huffman D.M, Calvert J.W. Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1940-1948.
 23. Rochette L, Meloux A, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Role of humanin, a mitochondrial-derived peptide, in cardiovascular disorders. *Archives of Cardiovascular Diseases* 2020; 113: 564-571.
 24. Zhao ST, Zhao L, Li JH. Neuroprotective peptide humanin inhibits inflammatory response in astrocytes induced by lipopolysaccharide. *Neurochem Res* 2013; 38: 581-588.
 25. Gottardo MF, Jaita G, Magri ML, et al. Antiapoptotic factor humanin is expressed in normal and tumoral pituitary cells and protects them from TNF- α -induced apoptosis. *PLoS One* 2014;9: e111548.
 26. Zacharias DG, Kim SG, Massat AE, et al. Humanin, a cytoprotective peptide, is expressed in carotid atherosclerotic [corrected] plaques in humans. *PLoS One* 2012; 7: e31065.
 27. Kuliawat R, Klein L, Gong Z, et al. Potent humanin analog increases glucose-stimulated insulin secretion through enhanced metabolism in the β cell. *FASEB J* 2013;27: 4890-4898.
 28. Thummasorn S, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. High-dose humanin analogue applied during ischemia exerts cardioprotection against ischemia/reperfusion injury by reducing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Ther* 2017; 35: e12289.
 29. Amado CA, Martín-Audera P, Agüero J, et al. Associations between serum mitokine levels and outcomes in stable COPD: an observational prospective study. *Sci Rep* 2022; 12: 17315.
 30. Zhang X, Urbieta-Caceres VH, Eirin A, et al. Humanin prevents intra-renal microvascular remodeling and inflammation in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice. *Life Sci* 2012; 91: 199-206.
 31. Zong P, Feng J, Yue Z, et al. TRPM2 deficiency in mice protects against atherosclerosis by inhibiting TRPM2-CD36 inflammatory axis in macrophages. *Nat Cardiovasc Res* 2022; 1: 344-360.
 32. Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, et al. Role of TRPM2 Channel in Mediating H₂O₂-Induced Ca²⁺ Entry and Endothelial Hyperpermeability. *Circ Res* 2008; 102: 347-355.
 33. Dietrich A, Gudermann T. Another TRP to Endothelial Dysfunction: TRPM2 and Endothelial Permeability. *Circ Res* 2008; 102: 275-277.
 34. Johnson A, Phillips P, Hocking D, et al. Protein kinase C inhibitor prevents pulmonary edema in response to H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1989; 256: 1012-1022.
 35. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001; 411:595-599.
 36. Lum H, Roebuck K. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: 719-741.

37. Kaslovsky RA, Parker K, Siflinger-Birnboim A, et al. Increased endothelial permeability after neutrophil activation occurs by a diffusion-dependent mechanism. *Microvasc Res* 1995; 49: 227.
38. Wang Q, Doerschuk CM. Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: Roles of ICAM-1 and reactive oxygen species. *J Immunol* 2000; 164: 6487.
39. Siflinger-Birnboim A, Malik AB. Regulation of endothelial permeability by second messengers. *New Horiz* 1996; 4: 87.
40. Han XB, Liu X, Hsueh W, et al. Macrophage inflammatory protein-2 mediates the bowel injury induced by platelet-activating factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 1220-1226.
41. Buanne P, Di Carlo E, Caputi L, et al. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. *J Leukoc Biol* 2007; 82:1239-1246.
42. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, et al. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Med* 2008; 14: 738-747